

# Imuno-histoquímica aplicada à cirurgia micrográfica de Mohs: estudo-piloto

*Immunohistochemistry and Mohs micrographic surgery: a pilot study*

DOI: <http://dx.doi.org/10.5935/scd1984-8773.20168402>

## RESUMO

**Introdução:** Na prática cirúrgica dermatológica, a cirurgia micrográfica de Mohs é de grande valia para a exérese de neoplasias cutâneas. No entanto, em determinados tipos de neoplasia, a imuno-histoquímica pode aumentar a acurácia diagnóstica.

**Objetivo:** Relatar o uso da cirurgia micrográfica de Mohs associada à imuno-histoquímica e avaliar sua eficácia em relação aos métodos tradicionais.

**Método:** Realizadas cirurgia micrográfica de Mohs em cinco casos de neoplasias cutâneas diversas e avaliação tecidual com hematoxilina-eosina e imuno-histoquímica, no intraoperatório.

**Resultados:** Maior prevalência de pacientes do sexo feminino, idosos, com maior frequência de neoplasias do tipo carcinoma basocelular recidivado, na face. Em todos os casos foi possível realizar a imuno-histoquímica na peça congelada e, na maioria dos casos, foi realizado fechamento primário no primeiro estágio da cirurgia de Mohs, sem complicações pós-operatórias.

**Conclusão:** A combinação das duas técnicas pode aumentar a sensibilidade, assegurando margens livres, permitindo menor número de recidivas e preservação de maior quantidade de tecido livre de neoplasia.

**Palavras-chave:** cirurgia de Mohs, imuno-histoquímica, neoplasias cutâneas

## ABSTRACT

**Introduction:** In the dermatologic surgery practice, Mohs micrographic surgery is of great value in the excision of cutaneous neoplasias. Nevertheless, in certain types of neoplasia, immunohistochemistry can increase diagnostic accuracy.

**Objective:** To describe the use of Mohs micrographic surgery associated to immunohistochemistry and evaluate their effectiveness regarding traditional methods.

**Method:** Mohs micrographic surgery was performed in 5 cases of diverse cutaneous neoplasias. Tissue evaluation with hematoxylin-eosin and immunohistochemistry were carried out intraoperatively.

**Results:** There was greater prevalence of elderly female patients with higher frequency of recurred basal cell carcinomas in the face. In all cases it was possible to perform immunohistochemistry in the frozen specimen. In most cases, primary closure was carried out in the first stage of the Mohs surgery, without postoperative complications.

**Conclusion:** The combination of the two techniques can increase the procedure's sensitivity, guaranteeing the presence of free margins, leading to fewer recurrences and allowing the preservation of a greater amount of neoplasia-free tissue.

**Keywords:** mohs surgery, Immunohistochemistry, skin neoplasms

## Artigo Original

### Autores:

André Luiz Simião<sup>1</sup>  
Marina de Almeida Delatti<sup>2</sup>  
Larissa Mondadori Mercadante<sup>2</sup>  
Amilcar Castro de Matos<sup>2</sup>  
Marcela Baraldi Moreira<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Responsável pelo Ambulatório de Tumores e Cirurgia Micrográfica de Mohs do Serviço de Dermatologia da Pontifícia Universidade Católica de Campinas (PUC) – Campinas (SP), Brasil.

<sup>2</sup> Residente de dermatologia da Pontifícia Universidade Católica de Campinas (PUC) – Campinas (SP), Brasil.

<sup>3</sup> Médico patologista do Serviço de Patologia da Pontifícia Universidade Católica de Campinas (PUC) – Campinas (SP), Brasil.

### Correspondência para:

André Luiz Simião  
Av. 14 de Dezembro, 1265. Apto:  
112F / Vila Mafalda  
13206 -105 –Jundiaí-SP  
**E-mail:** andresimiao@gmail.com

Data de recebimento: 10/10/2016

Data de aprovação: 14/11/2016

Trabalho realizado na Pontifícia Universidade Católica de Campinas (PUC) – Campinas (SP), Brasil.

**Suporte Financeiro:** Nenhum  
**Conflito de Interesses:** Nenhum

## INTRODUÇÃO

Em 1930, o doutor Frederic Mohs, em Wisconsin, EUA, foi o primeiro a desenvolver o conceito da cirurgia micrográfica. Enquanto estudava o efeito da injeção de diferentes substâncias em neoplasias, notou que, ao adicionar cloreto de zinco, havia necrose tissular, porém com preservação da estrutura microscópica da neoplasia, como se tivesse sido processada de acordo com a rotina anatomopatológica. Dessa forma, inferiu que a fixação *in situ* poderia ser utilizada conjuntamente com procedimentos cirúrgicos para remover neoplasias de maneira microscopicamente controlada. Adicionalmente, também desenvolveu a ideia do uso de cortes horizontais congelados para avaliação de 100% das margens, em vez do tradicional corte vertical, permitindo dessa forma a avaliação da totalidade das margens do tecido (profunda e periférica), com maior taxa de cura. Em 1941 publicou seu primeiro artigo científico, mostrando o tratamento de 440 pacientes em quatro anos, e logo chamou a atenção da comunidade dermatológica. Em 1951, Mohs desenvolveu a assim chamada cirurgia micrográfica de Mohs (CMM), removendo os tumores para depois realizar a fixação, conhecida como técnica do tecido fresco. Isso tornou a técnica mais rápida, mais tolerável para o paciente e com maior preservação de tecido saudável, fazendo-a a técnica padrão ouro para o tratamento de algumas neoplasias de pele, primárias ou recorrentes.<sup>1</sup>

Com o passar dos anos, a frequência dessa cirurgia foi aumentando, principalmente após o advento da congelação de tecidos, sendo hoje o método mais confiável para a remoção de malignidades cutâneas.<sup>2,3</sup>

A imuno-histoquímica (IH) é técnica utilizada para detectar antígenos específicos a partir da utilização de anticorpos previamente selecionados, podendo ser realizada de duas formas: direta ou indireta. A forma direta requer maior quantidade de anticorpos, tendo menor sensibilidade e por isso vem sendo cada vez menos utilizada. Com menor necessidade de anticorpos, a forma indireta é mais eficaz e a mais utilizada atualmente, tendo sido a técnica empregada no presente estudo.<sup>4,5</sup>

Desde 1980 a IH vem sendo incorporada à CMM, visando a maior sensibilidade do método, uma vez que facilita a interpretação dos resultados anatomopatológicos, sendo porém pouco utilizada nos dias de hoje.<sup>6</sup> Este trabalho tem como objetivo demonstrar a aplicabilidade da imuno-histoquímica na CMM, suas vantagens e limitações. É o primeiro trabalho na literatura brasileira a descrever o uso dessa técnica, em serviço de dermatologia de um hospital universitário, tendo aplicação para diversos tipos de neoplasias cutâneas.

## MÉTODOS

São relatados cinco casos cirúrgicos de pacientes de um serviço de residência médica de dermatologia, ocorridos em 2015, nos quais foi realizada a CMM em diferentes tumores cutâneos, tanto epiteliais quanto mesenquimais. As cirurgias foram realizadas conforme os padrões exigidos pela técnica, com exérese das lesões seguidas de mapeamento, aplainamento dos fragmentos, congelação, corte e confecção das lâminas para co-

loração com hematoxilina-eosina (HE) e estudo imuno-histoquímico.

A IH foi realizada nas lâminas correspondentes, utilizando o sistema automatizado do aparelho BenchMarck Ultra (Ventana medical systems, Inc. Roche USA) e os seguintes marcadores: AE1 e AE3 (pancitoqueratinas) para as neoplasias epiteliais, CD 34 para os tumores mesenquimais e enolase para avaliação neural. Uma vez constatada a ausência de neoplasia nas margens, foram realizadas as correções dos defeitos cirúrgicos.

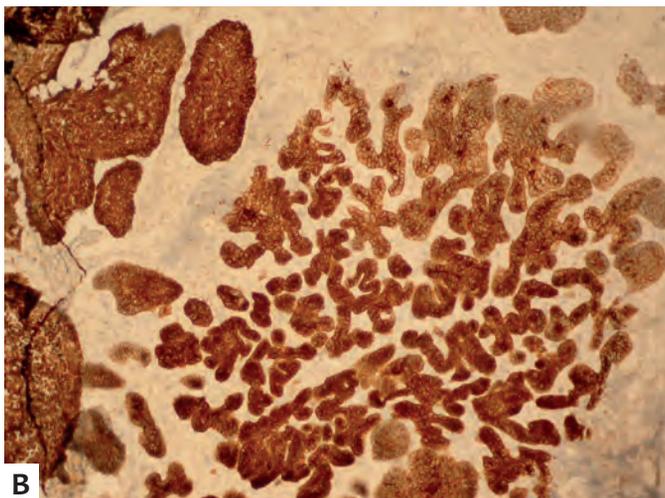
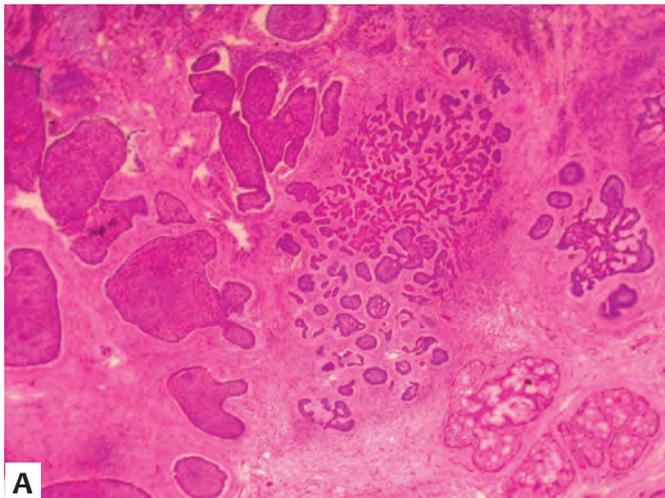
O estudo foi realizado de acordo com os princípios éticos que constam na Declaração de Helsinki e que são coerentes com as Boas Práticas Clínicas e requerimentos regulatórios aplicáveis, e conduzido conforme os regulamentos federais vigentes e as diretrizes da Conferência Internacional de Harmonização (International Conference of Harmonization – ICH).

Um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi obtido de cada paciente antes da realização dos procedimentos.

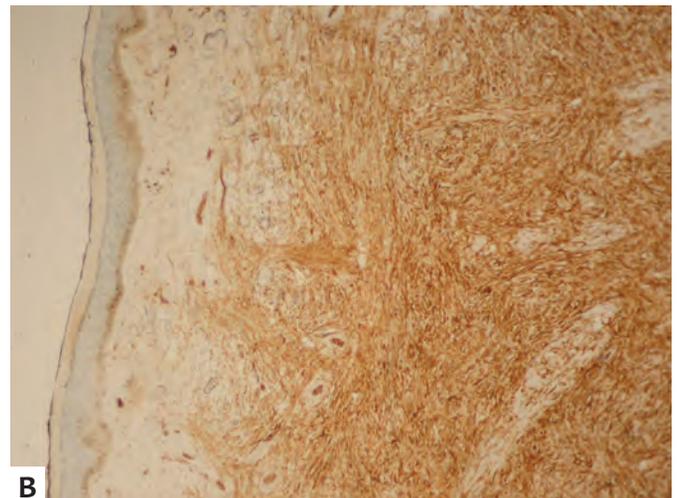
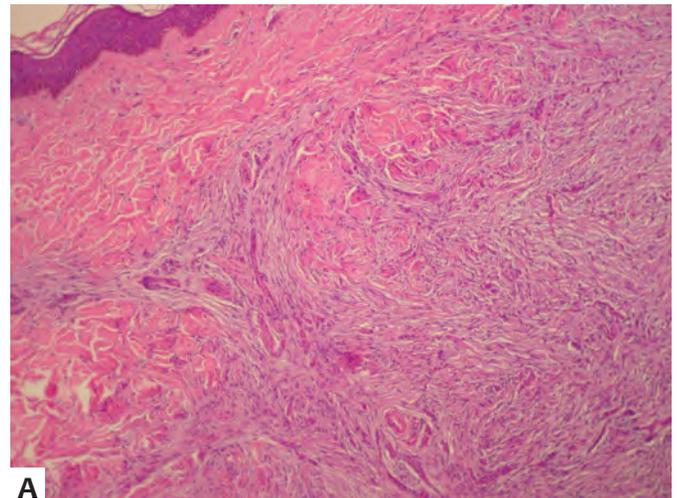
## DESCRIÇÃO DOS CASOS

1- PG, do sexo masculino, 74 anos, em acompanhamento no serviço de dermatologia por diversas neoplasias de pele, apresentou, em 2015, nova lesão na parede lateral nasal esquerda: placa eritemato-perlácea, de aproximadamente 1,2cm de diâmetro, com bordas mal delimitadas e telangiectasias visíveis, encimada por crostícula hemática, com diagnóstico de carcinoma basocelular (CBC) sólido expansivo após biópsia incisional. Para a exérese dessa lesão, optou-se pela CMM associada à IH, devido à localização nobre e má delimitação das margens e proximidade com cicatriz cirúrgica prévia. Foi realizada delimitação da neoplasia, com margens cirúrgicas de dois milímetros e exérese da lesão com confecção das margens laterais e profunda, com posterior congelamento das peças. A avaliação das margens foi realizada por meio da coloração HE (Figura 1A) e técnica de IH utilizando o painel de citoqueratinas AE1/AE3. Todas as margens cirúrgicas estavam livres de comprometimento neoplásico após o primeiro estágio da cirurgia micrográfica. Foi então realizado *debulking* tumoral, com congelação e coloração HE e IH AE1/AE3 para visualização tumoral e avaliação da técnica de IH na peça congelada (Figura 1B). Com todas as margens livres, procedeu-se a reconstrução da ferida operatória, mantendo-se o seguimento clínico do paciente.

2- TGZ, do sexo masculino, 33 anos, iniciou seguimento no serviço em agosto de 2015 devido a lesão na perna esquerda há um ano, assintomática, com crescimento progressivo. Já havia sido submetido a cirurgia para exérese dessa lesão em maio de 2015 com o diagnóstico de dermatofibrossarcoma protuberans. Ao exame dermatológico, apresentava placa acastanhada infiltrada, de um centímetro, bem delimitada. Foi então aventada a hipótese diagnóstica de dermatofibrossarcoma protuberans recidivado, optando-se pela realização de CMM, procedimento considerado padrão ouro para o tratamento dessa neoplasia. Foi realizada a exérese da lesão com margens de um centímetro, tendo sido dividida em oito fragmentos. Na congelação e posterior coloração com HE não ocorreu comprometimento neoplásico



**FIGURA 1:** A - Caso 1 - Hematoxilina-eosina, CBC micronodular (*debulking*);  
B - Caso 1 - Imuno-histoquímica com marcadores AE1/AE2 positiva, CBC micronodular (*debulking*)



**FIGURA 2:** A - Caso 2 - Dermatofibrossarcoma protuberans HE (*debulking*);  
B - Caso 2 - IH CD-34 positiva para células fusiformes sugestiva de dermatofibrossarcoma protuberans (*debulking*)

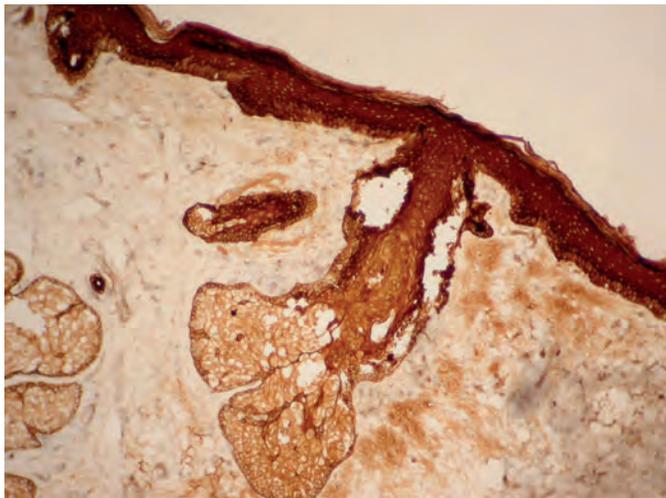
dos fragmentos, sendo necessário apenas um estágio da cirurgia, seguido de fechamento primário (Figura 2A). Seguiu-se o *debulking* tumoral, com congelação, HE e IH com CD34 para visualização tumoral e avaliação da técnica de imuno-histoquímica na peça congelada (Figura 2B).

3- PSL, do sexo feminino, 66 anos, em acompanhamento no Serviço de Dermatologia devido a múltiplas queratoses actínicas. Em julho de 2015, notou-se, ao exame dermatológico, pápula eritematosa, perlácea, de 0,8cm, com ulceração central, na asa nasal direita, tendo sido realizado biópsia incisional que resultou em CBC metatípico com diferenciação escamosa. Devido à localização nobre e ao subtipo histológico da neoplasia a paciente foi encaminhada para a CMM. Foram delimitadas margens cirúrgicas de dois milímetros, sendo elas divididas em quatro fragmentos, que se mostraram todos livres de neoplasia

no primeiro estágio. A IH realizada com as pancitoqueratinas AE1 e AE3 também não evidenciou comprometimento tumoral nas margens (Figura 3). A reconstrução da ferida operatória foi realizada por um retalho de transposição.

4- MCC, do sexo feminino, 74 anos, encaminhada ao Serviço de Dermatologia com lesão na região malar esquerda e diagnóstico de CBC infiltrativo após biópsia incisional, tendo sido encaminhada para a realização de CMM. As margens apresentaram-se livres no primeiro estágio, porém, na margem B, havia presença de grandes células que foram submetidas à IH para confirmação da histogênese. Os anticorpos AE1/AE3 foram negativos na topografia B, podendo-se concluir que as margens cirúrgicas estavam livres de neoplasia. Realizou-se fechamento primário da ferida operatória.

5- MCGS, do sexo feminino, 47 anos, encaminhada ao

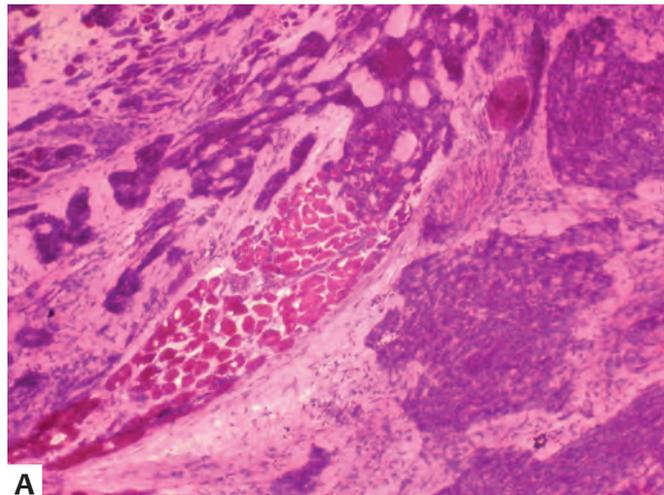


**FIGURA 3:** CASO 3 - IH AE1/AE3 evidenciando epiderme e glândula sebácea (margem livre)

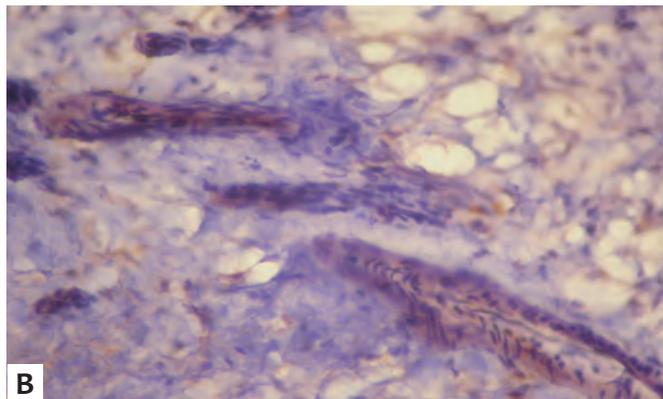
serviço de dermatologia para seguimento clínico após ter sido realizada exérese completa de CBC sólido e esclerodermiforme com nível de infiltração neoplásica até derme profunda e invasão perineural, no epicanto lateral esquerdo. Ao exame dermatológico inicial, apresentava apenas cicatriz com bom aspecto, sem sinais de recidiva. No entanto, após três meses, houve o aparecimento de placa infiltrada de 1cm, endurecida, com telangiectasias, na região medial da cicatriz. Foi aventada hipótese diagnóstica de CBC recidivado, optando-se por realização de biópsia incisional em três pontos. O laudo anatomopatológico revelou CBC infiltrativo, atingindo tecido muscular esquelético na profundidade (Figura 4A). Dessa forma, foi realizada a CMM, uma vez que apresentava invasão de tecidos profundos. A cirurgia constou de dois estágios, devido ao fato de as margens A, C e F estarem comprometidas, tendo sido efetuada sua ampliação. Foi realizada a IH com enolase para evidenciar feixe nervoso, que se mostrou livre de comprometimento neoplásico (Figura 4B). O defeito cirúrgico foi corrigido por fechamento direto.

## RESULTADOS

Foram tratados cinco pacientes entre 33 e 74 anos, de ambos os sexos, com diferentes neoplasias de pele. Observou-se maior prevalência do sexo feminino e de idade superior a 60 anos (Gráfico 1). A localização mais frequente foi a nasal, sendo 80% das neoplasias localizadas na face, e não houve complicações pós-operatórias em nenhum caso. O diagnóstico histológico de CBC infiltrativo foi o mais comum, sendo três neoplasias recidivadas e duas neoplasias primárias (Tabela 1). A única cirurgia que necessitou de dois estágios foi a de uma neoplasia recidivada, tendo a maioria sido submetida a fechamento primário no primeiro estágio. Quanto aos marcadores imuno-histoquímicos optou-se pelo uso do AE1/AE3, CD 34 e enolase (Tabela 2). Foi



**A**



**B**

**FIGURA 4:** A - Caso 5 - HE, CBC com infiltração da musculatura profunda. Feixe nervoso livre; B - Caso 5 - IH enolase, feixe nervoso sem tumor

demonstrado nesse estudo-piloto a possibilidade do uso de diferentes marcadores imuno-histoquímicos nas peças congeladas, abrindo a possibilidade de aumentar ainda mais a sensibilidade e a eficácia de margens livres.

## DISCUSSÃO

A CMM é técnica cirúrgica que consiste na delimitação das margens clínicas do tumor inicialmente e, em seguida, das margens cirúrgicas, com distância de dois milímetros ou mais entre elas. A peça cirúrgica é dividida em fragmentos e mapeada para correta orientação espacial durante sua análise. O aplainamento é realizado para que haja completa visualização da epiderme e derme em um único plano do fragmento e em seguida ocorre o congelamento dos tecidos. As lâminas são então preparadas para avaliação histológica, e coradas com HE, utilizada para todas as neoplasias cutâneas.<sup>3,7</sup>

Uma vez realizados tais procedimentos, o cirurgião dermatológico avalia as lâminas para verificar o comprometimento das margens. Para margens cirúrgicas livres de neoplasia, já pode ser realizada a reconstrução do defeito cirúrgico; para margens comprometidas, tanto laterais quanto profundas, são realizadas novas ampliações até que todas sejam consideradas livres de neo-

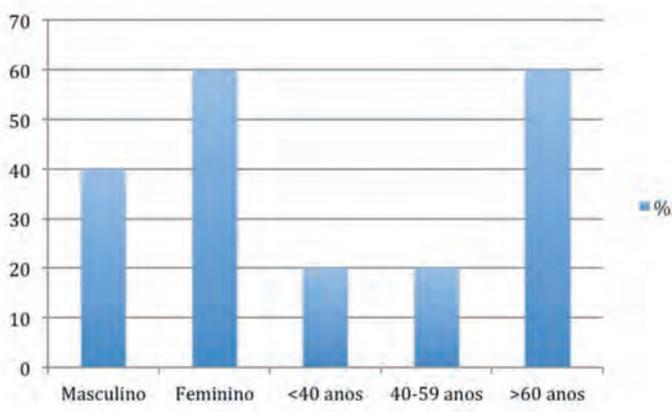


GRÁFICO 1: Estatística descritiva de sexo e idade

plasia. Permite-se assim o controle histológico completo com a avaliação de 100% das margens.<sup>3,7</sup>

As indicações para CMM são: tumores recorrentes; tumores não completamente excisados; tumores de pele não melanoma superiores a 0,4cm localizados em áreas com alto risco de recorrência local (central da face, periocular, periauricular); tumores localizados em áreas em que a preservação de tecido e alta taxa de cura são importantes; tumores com margens clínicas mal definidas; tumores com subtipos histológicos agressivos (CBC micronodular, infiltrativo, escamoso ou esclerodermiforme e carcinoma espinocelular pouco diferenciado) ou com evidência de infiltração perineural e perivascular; tumores sobre áreas irradiadas ou cicatrizes; tumores em áreas nobres como genital, anal, mãos e pés; tumores em expansão em pacientes imunossuprimidos; pacientes geneticamente predispostos a desenvolver

múltiplos cânceres de pele (xeroderma pigmentoso, síndrome de Gorlin-Goltz).<sup>3,4,7</sup>

A IH é técnica laboratorial utilizada para detectar antígenos específicos nos cortes tissulares, que pode ser realizada de duas maneiras. O método original ou direto permite que um único anticorpo, previamente conjugado a uma enzima, interaja com o antígeno presente na célula de interesse. Em seguida é adicionado um substrato, que reage apresentando fluorescência quando em contato com a enzima. Esse método requer altas concentrações de anticorpos, o que diminui a sensibilidade. No método indireto, um anticorpo primário se liga a um antígeno específico, e, em seguida, é adicionado um segundo anticorpo, conjugado a uma enzima, que se liga a esse complexo primário. Um substrato é então adicionado e, quando em contato com a enzima, fluoresce. Dessa forma, uma menor concentração de anticorpos é necessária, o que aumenta a sensibilidade e eficácia.<sup>4,5</sup> Desde 1980, a IH foi incorporada à CMM, uma vez que permitia reconhecer mais facilmente as células neoplásicas. Sua aplicabilidade, porém, era limitada, pois seu longo período de preparação determinava maior tempo cirúrgico, além de apresentar alto custo, contar com poucos profissionais capacitados e também pelo fato de haver na área poucos estudos a esse respeito.<sup>6</sup> Esse tema tem sido cada vez mais abordado por diversas pesquisas nos últimos 20 anos, além de mais escolas se terem capacitado para o ensino da técnica. Dessa forma, o papel da imuno-histoquímica na CMM tem-se consolidado, dobrando na última década, e provou-se que na técnica de congelamento há preservação do conteúdo antigênico, dando aos anticorpos melhor habilidade de identificar e rastrear os antígenos (células tumorais).<sup>5,6</sup>

Atualmente, diversos marcadores podem ser utilizados na técnica de IH, a depender do tipo tumoral apresentado. Exemplos são: Melan-A, S100, HMB45, citoqueratinas, entre outros.<sup>2,4,5</sup>

As vantagens da imuno-histoquímica na CMM se dão

TABELA 1: Estatística descritiva: localização tumoral, diagnóstico anatomopatológico e presença de recidiva

Variável	Frequência	%
<b>Localização tumoral</b>		
Nariz	2	40
Malar	1	20
Epicanto Lateral	1	20
Perna	1	20
<b>Diagnóstico anatomopatológico</b>		
CBC sólido expansivo	1	20
CBC metatípico diferenciação	1	20
CBC infiltrativo	2	40
Dermatofibrossarcoma protuberans	1	20
<b>Tumor recidivado</b>		
Sim	3	60
Não	2	40

pelo aumento da habilidade em identificar células tumorais, incluindo os casos mais difíceis, como aqueles cujas neoplasias mimetizam estruturas normais ou estão entremeadas ao processo inflamatório denso ou ao tecido fibrótico e aquelas com invasão perineural. Também se observa o aumento da acurácia na identificação de margens cirúrgicas livres e comprometidas, levando à diminuição das taxas de recidivas e da retirada desnecessária de tecido normal.<sup>2,5</sup>

As desvantagens incluem maior tempo e múltiplos passos requeridos no processo de coloração dos tecidos, lembrando que os reagentes possuem alto custo e curto período de validade. O aumento no número e capacitação dos profissionais nos laboratórios de Mohs, incluindo técnicos e cirurgiões, e o aumento do tempo de espera pelo paciente também se apresentam como fatores limitantes.<sup>2</sup> Trimble et al.,<sup>6</sup> realizaram estudo em que cirurgiões de Mohs credenciados listaram os principais motivos para a não utilização da IH, que foram, em ordem de aparecimento: aumento do tempo cirúrgico, falta de treinamento e custo elevado.

Hoje em dia um dos principais enfoques das pesquisas nesse campo tem sido a redução do tempo do processo de coloração e da cirurgia como um todo. Estudos mostram que protocolos rápidos (até 30 minutos) já foram desenvolvidos e apresentam eficácia igual à dos protocolos tradicionais (em média uma hora), sem comprometer a confiabilidade do método.<sup>8,9</sup>

## CONCLUSÃO

O uso da IH na CMM definitivamente está em expansão, mas ainda se faz necessária maior quantidade de estudos. O uso da coloração em secções congeladas tem-se mostrado útil nas variadas formas de neoplasias cutâneas, permitindo o aumento da detecção de células tumorais, mas para isso é necessário um aumento no número de equipes treinadas para sua realização.

A IH dá espaço para a expansão e o crescimento da aplicabilidade da CMM, principalmente nos tumores de difícil delimitação histológica. Dessa forma, aumenta a sensibilidade para a identificação de células tumorais, possibilitando preservar tecido normal em maior quantidade e diminuir recidivas, oferecendo aos pacientes um tratamento de melhor qualidade. ●

## REFERÊNCIAS

1. Trost LB, Bailin PL. History of Mohs Surgery. *Dermatol Clin.* 2011;29(2):135-9
2. Stranahan D, Cherpelis BS, Glass LF, Ladd S, Fenske NA. Immunohistochemical stains in Mohs surgery: a review. *Dermatol Surg.* 2009;35(7):1023-34.
3. Benedetto PX, Poblete-Lopez C. Mohs micrographic surgery technique. *Dermatol Clin.* 2011;29(2):141-51.
4. El Tal AK, Abrou AE, Stiff MA, Mehregan DA. Immunostaining in Mohs micrographic surgery: a review. *Dermatol Surg.* 2010;36(3):275-90.
5. Thosani MK, Marghoob A, Chen CS. Current progress of immunostains in Mohs micrographic surgery: a review. *Dermatol Surg.* 2008;34(12):1621-36.
6. Trimble JS, Cherpelis BS. Rapid immunostaining in Mohs: current applications and attitudes. *Dermatol Surg.* 2013;39(1 Pt 1):56-63.
7. Reis NA, Azevedo LCM, Stolf HO, Nouri K, Kimyai-Asadi A, Goldberg LH. Cirurgia micrográfica de Mohs. *Surg Cosmet Dermatol.* 2011;3(3):227-31.
8. Cherpelis BS, Turner L, Ladd S, Glass LF, Fenske NA. Innovative 19-minute rapid cytokeratin immunostaining of nonmelanoma skin cancer in Mohs micrographic surgery. *Dermatol Surg.* 2009;35(7):1050-56.
9. Cherpelis BS, Moore R, Ladd S, Chen R, Glass LF. Comparison of MART-1 frozen sections to permanent sections using a rapid 19-minute protocol. *Dermatol Surg.* 2009;35(2):207-13